

桃叶杜鹃组织培养技术研究

苗永美^{1,2}, 王永清¹, 庄平³, 简兴²

(1. 四川农业大学林学院园艺学院, 雅安 625014 2. 安徽科技学院生命科学学院, 凤阳 233100;
3. 中科院华西亚高山植物园, 都江堰 611830)

摘要 选用桃叶杜鹃试管苗的芽苗、叶片进行离体培养, 通过正交试验设计并结合方差分析、多重比较从中选出了不同中间繁殖体的最佳培养基配方。试验结果表明: 改良 MS 和 6-BA 及 KT 不适合桃叶杜鹃的组织培养, 相对较低浓度的 TDZ 却能诱导植株分化, 建立起桃叶杜鹃的离体培养体系, 达到保护名贵杜鹃的种质资源、加速繁殖的目的。

关键词 杜鹃; 组织培养; TDZ; 活性炭

中图分类号 S685.21; Q813.12

文献标识码 A

文章编号 1008-963X(2006)06-0029-03

桃叶杜鹃(*Rhododendron anne* Franch)是常绿乔木, 非常珍贵且观赏价值极高。此杜鹃分布区域窄, 仅在云南、西藏的某些地区有所发现^[1]。桃叶杜鹃的种子极小, 发芽条件高, 因此靠播种较难繁殖^[2]。杜鹃花是典型的喜酸性植物, 由于自然界缺乏耐碱杜鹃种质资源, 因而很难通过常规杂交育种方法获得耐碱品种, 又由于目前对杜鹃花的耐碱机理尚不清楚, 因此利用基因工程方法培育耐碱品种也很难实现, 这些原因都会限制了桃叶杜鹃的开发和利用。通过组织培养可实现桃叶杜鹃的快速繁殖, 保护了名贵杜鹃种质资源, 另外在组培中植物细胞经诱导或非诱导发生的体细胞无性系变异具有较高的频率, 可通过有目的的筛选耐碱突变体, 为杜鹃花耐碱育种提供种质资源。^[3]

1 材料与方 法

1.1 试验材料

桃叶杜鹃的种子(采自云南腾冲)无菌发芽得试管苗, 然后取试管苗的芽苗、叶片进行培养。

1.2 试验方法

1.2.1 试验地点 四川农业大学生物技术脱毒中心, 时间 2003年3月~2004年5月。

1.2.2 材料的消毒 种子先用无菌水浸泡 2h, 再用 0.1% 升汞消毒 20min, 无菌水洗 4~5 次。用滤纸吸干水分用于接种。

1.2.3 培养方法 (1)种子接种在 Read + 1mg/L GA₃ 培养基上, 无菌发芽得试管苗。(2)将芽苗接种到 Read 培养基附加不同浓度的 6-BA、KT、TDZ 和 NAA, 筛选出最佳细胞分裂素。(3)芽苗和叶片培养, 用三因素(用培养基、TDZ 分别和 IBA、NAA 组合)三水平进行正交方案设计。壮苗生根培养用 Read 作为基本培养基。蔗糖 30g/L, 琼脂粉 5g/L, 叶片先暗培养两周再光培养, 每处理接种

40 左右个材料, 重复 3 次。

1.2.4 培养条件 培养温度为(25 ± 2)°C, 每天光照 12h, 光照强度 2000 lx ±。将每个处理的 3 次重复试验结果用 SPSS for windows 11.0 分析软件进行方差分析和多重比较。

2 结果与分析

2.1 细胞分裂素对杜鹃生长的影响

表 1 不同细胞分裂素对桃叶杜鹃生长的影响

Table 1 Effect of different cytokinin on the growth of *Rhododendron*

| 激素组合 hormone combination | 长势及增殖 growing trend and multiplication |
|-----------------------------|---|
| 6-BA2.00 + NAA0.05 | 只进行少量的伸长生长, 未增殖 |
| KT2.00 + NAA0.05 | 只进行少量的伸长生长, 未增殖 |
| 6-BA1.00 + KT1.00 + NAA0.05 | 只进行少量的伸长生长, 未增殖 |
| TDZ0.20 + NAA0.05 | 大部分苗的腋芽萌发, 长势好 |

注: 激素单位均为 mg/L, 下同

6-BA、KT 不是桃叶杜鹃增殖的最佳细胞分裂素, 而低浓度的 TDZ 却能使桃叶杜鹃发生一定的增殖, 所以本试验选用 TDZ 作为培养桃叶杜鹃的最佳细胞分裂素。

2.2 芽苗的继代增殖培养

培养一周时, 发现有材料顶芽萌动、腋芽萌发, 基部开始膨大, 但是有的材料出现死亡现象, 20d 左右腋芽及膨大的基部逐渐分化出不定芽。将三因素三水平对桃叶杜鹃增殖的影响列于表 2。培养中发现在改良 MS 培养基上桃叶杜鹃生长不好, 甚至有的芽苗死亡, 在 Read 培养基上表现最好。IBA 和 NAA、TDZ 皆是桃叶杜鹃增殖的显著因素, 所试浓度范围内, NAA 比 IBA 好, 当 NAA 是 0.05mg/L 时, 各项指标都达到最大, 并且随着 TDZ 浓度的升高, 两个指标先增大后降低, 当 TDZ 是 0.30mg/L 时达最大, 说明过低和过高浓度的 TDZ 不利于桃叶杜鹃的增殖培养。

表 2 桃叶杜鹃在继代增殖中三因素多重比较

Table 2 Multiple comparisons of factors in sub-culture of *Rhododendron*

| 因素 | 水平 | 增殖倍数 | 平均株分化芽数 |
|---------|-------|--------------------|-----------------------------------|
| Factors | Level | Reproduction times | Number of shoots per microcutting |
| 培养基 | 改良 MS | 1.62Bc | 1.65Bb |
| | Read | 2.63Aa | 2.14Aa |
| | WPM | 2.00Bb | 1.83Bb |
| TDZ | 0.20 | 2.17 | 1.73Bb |
| | 0.30 | 2.17 | 2.06Aa |
| | 0.40 | 1.92 | 1.83ABb |
| IBA | 0.01 | 1.70Bb | 1.70Bb |
| | 0.05 | 1.97Bb | 1.81Bb |
| | 0.10 | 2.58Aa | 2.11Aa |
| 培养基 | 改良 MS | 2.00Bc | 1.52Bb |
| | Read | 3.50Aa | 2.91Aa |
| | WPM | 2.39Bb | 1.83Bb |
| TDZ | 0.20 | 2.68Bb | 1.75Bb |
| | 0.30 | 3.22Aa | 2.50Aa |
| | 0.40 | 1.99Cc | 2.09ABab |
| NAA | 0.01 | 1.68Cc | 1.37Bb |
| | 0.05 | 3.36Aa | 2.59Aa |
| | 0.10 | 2.85Bb | 2.38Aa |

注:小写字母表示在 0.05 水平上显著,大写字母表示在 0.01 水平上显著,字母相同者表示水平间不显著(下同)

2.3 叶片培养

表 3 桃叶杜鹃叶片愈伤组织诱导中的因素多重比较

Table 3 Multiple comparisons of factors in callus induction of leaves

| 因素 | 水平 | 诱导率(%) | 平均每块质量(mg) |
|---------|-------|----------------|---------------------|
| Factors | Level | Induction rate | Weight of per piece |
| 培养基 | 改良 MS | 30.28Bb | 10.17Bc |
| | Read | 47.22Aa | 29.34Aa |
| | WPM | 38.06ABb | 18.57Bb |
| TDZ | 0.50 | 29.44Bb | 9.57Bb |
| | 1.00 | 66.11Aa | 24.79Aa |
| | 1.50 | 35.83Bb | 23.72Aa |
| IBA | 0.10 | 40.83 | 21.62 |
| | 0.20 | 39.17 | 15.32 |
| | 0.40 | 51.39 | 21.13 |
| 培养基 | 改良 MS | 16.67Bc | 4.33Bb |
| | Read | 74.17Ab | 38.00Aa |
| | WPM | 87.78Aa | 36.57Aa |
| TDZ | 0.50 | 43.62Bb | 15.32Bb |
| | 1.00 | 83.33Aa | 43.88Aa |
| | 1.50 | 51.67Bb | 19.70Bb |
| NAA | 0.10 | 51.67Bb | 23.85 |
| | 0.20 | 72.50Aa | 26.29 |
| | 0.40 | 54.45Bb | 28.76 |

经过两周暗培养,发现大部分叶片皱缩,叶脉膨大,有的叶块切口处及叶柄处产生少量愈伤组织。一个月时部分叶片在切口处和叶柄端有绿色小芽产生。杜鹃的愈伤组织再分化不是很成功,没有得到理想的结果。两个月时统计愈伤组织的诱导率、平均每块愈伤组织质量(mg)、出芽率、平均每叶出芽,并进行差分析多重比较(表 3、表 4)。

WPM 是叶片培养的最佳培养基,另外两种培养基不是很好。从表 3、表 4 看出,在所试浓度范围内,对桃叶杜

鹃愈伤组织的诱导及其生长,NAA 比 IBA 要好,但是 IBA 比 NAA 更适合桃叶杜鹃叶片不定芽的诱导。不论哪种激素组合,桃叶杜鹃愈伤组织的诱导率及质量随着 TDZ、NAA 浓度的增大先升高后降低,TDZ 1.0mg/L、NAA 0.2mg/L 时最高。试验结果还表明,在 TDZ 1.50mg/L、IBA 0.20mg/L 时,桃叶杜鹃叶片的出芽率和平均每叶出芽数都达最高,低浓度的 TDZ 和高浓度的生长素不能诱导出不定芽。

表 4 桃叶杜鹃叶片不定芽诱导中的因素多重比较

Table 4 Multiple comparisons of factors in adventitious shoots induction of leaves

| 因素 | 水平 | 出芽率(%) | 平均每叶出芽数 |
|---------|-------|-------------------|---------------------------|
| Factors | Level | Regeneration rate | Number of shoots per leaf |
| 培养基 | 改良 MS | 13.89 | 0.50 |
| | Read | 10.83 | 0.33 |
| | WPM | 25.83 | 0.83 |
| TDZ | 0.50 | 0.00Bb | 0.00b |
| | 1.00 | 13.89ABb | 0.50ab |
| | 1.50 | 36.67Aa | 1.167a |
| IBZ | 0.10 | 10.83b | 0.33ABb |
| | 0.20 | 39.72a | 1.33Aa |
| | 0.40 | 0.00b | 0.00Bb |
| 培养基 | 改良 MS | 12.50 | 0.33 |
| | Read | 0.00 | 0.00 |
| | WPM | 12.22 | 0.50 |
| TDZ | 0.50 | 0.00 | 0.00 |
| | 1.00 | 12.50 | 0.33 |
| | 1.50 | 12.22 | 0.50 |
| NAA | 0.10 | 0.00Bb | 0.00Bb |
| | 0.20 | 24.72Aa | 0.83Aa |
| | 0.40 | 0.00Bb | 0.00Bb |

表 5 壮苗培养中的因素多重比较

Table 5 Multiple comparisons of factors in strengthening culture

| 因素 | 水平 | 平均每芽新长出的叶数 |
|---------|-------|------------------------------|
| Factors | Level | Average new leaves per shoot |
| TDZ | 0.00 | 2.03Aa |
| | 0.10 | 2.34Aa |
| | 0.20 | 1.27Bb |
| IBA | 0.10 | 1.67Bb |
| | 0.20 | 1.75Bb |
| | 0.40 | 2.23Aa |
| AC | 0.10% | 1.70Bb |
| | 0.20% | 2.56Aa |
| | 0.40% | 1.40Bb |
| TDZ | 0.00 | 1.75Bc |
| | 0.10 | 2.19Bb |
| | 0.20 | 3.08Aa |
| NAA | 0.10 | 2.36ab |
| | 0.20 | 2.58a |
| | 0.40 | 2.09b |
| AC | 0.10% | 2.96Aa |
| | 0.20% | 1.98Bb |
| | 0.40% | 2.08Bb |

2.4 壮苗培养

在 TDZ - IBA 组合中,过高浓度的 TDZ 不利于桃叶杜

鹃新叶的展开。随着 IBA 浓度升高,新展叶数也增多,而随着 AC 量的增加,新展叶数先增多后减少,这可能与高浓度的 AC 的吸附力太强有关。在 TDZ - NAA 中,随着 TDZ 浓度提高,展叶数也增多,过低过高浓度的 NAA 不利于苗的生长,NAA0.2mg/L 时最好;高浓度的 AC 不利于桃叶杜鹃的生长。0.10% AC 壮苗效果最佳。

2.5 生根培养

培养 20d 时,发现在没加 AC 的处理上,根较多但苗弱发黄弯曲,在含有过高浓度的 AC 的处理上没有根生出,35d 统计生根率和平均生根数并将分析结果列于表 6。通过四因素对桃叶杜鹃生根进行考察,发现两种生长素和 AC 是生根的主要因子,蔗糖(10~30g/L)则不是。IBA 生根效果比 NAA 好,生根率与平均根数都随着 IBA、NAA 浓度的升高先增大后降低,IBA1.00mg/L,NAA0.50mg/L 时,生根率和平均根数达最高。不加 AC 时生根情况最差,加 AC 的三个水平相互之间差异不是很明显,但 0.20% 的 AC,生根率和平均根数最高。

表6 桃叶杜鹃生根主效因子的多重比较

Table 6 Multiple comparisons of primary factors in rooting

| 因素 Factors | 水平 Level | 生根率(%) Rooting rate | 平均根数 Average number of roots |
|---------------|-------------|------------------------|---------------------------------|
| IBA | 0.25 | 32.13 Bc | 2.37 Bc |
| | 0.50 | 50.13 Aab | 3.19 Aab |
| | 1.00 | 59.38 Aa | 3.55 Aa |
| | 1.50 | 46.50 Ab | 2.93 ABb |
| NAA | 0.25 | 43.50 b | 2.95 b |
| | 0.50 | 56.50 a | 3.48 a |
| | 1.00 | 40.63 b | 2.67 b |
| | 1.50 | 47.50 ab | 2.93 b |
| AC | 0.00 | 38.75 b | 2.70 b |
| | 0.20% | 57.13 a | 3.43 a |
| | 0.40% | 50.13 ab | 3.13 ab |
| | 0.60% | 42.13 b | 2.78 b |

3 讨论

桃叶杜鹃在 Anderson 的改良 MS 上不仅分化率低,且材料有死亡现象,分析可能是 Anderson 的改良 MS 中高含

量的铁对植物不利。6-BA 是组培中较常用的一种细胞分裂素,能使大部分植物发生分化获得植株再生,然而对有些植物来说却不合适,Anderson 最早观察到,6-BA 对山杜鹃只能维持较低的嫩茎增殖,并常常表现出毒害^[4],本研究中也出现了同样结果。范玉清认为 TDZ 由于活性较强,是用来培养较顽固的尤其是木本植物的一种较合适的细胞分裂素^[5]。发现桃叶杜鹃的芽苗在含有 2.00mg/L 的 6-BA 或 KT 培养基上没有发生增殖,仅用 0.20mg/L 的 TDZ 就能使芽苗发生一定的增殖,0.40mg/L 的 TDZ 却抑制了增殖,这说明 TDZ 是一种具有较高生物活性的物质,较低浓度就具有强的细胞增殖作用。虽然 TDZ 使桃叶杜鹃发生较为理想的增殖,但是用 TDZ 增殖出的小苗如果仍放在原来培养基上继续培养,发现小苗不容易长高,这同样在一杜鹃(*R. 'P. J. M. Hybrids'*)叶片不定芽培养^[6]和香椿腋芽增殖^[7]中也发现类似现象发生,所以通过降低 TDZ 或不用 TDZ 并附加一定浓度的 AC 进行壮苗培养。对于桃叶杜鹃愈伤组织的再分化需要进一步研究。

参考文献:

[1] 余树勋. 杜鹃花[M]. 北京: 金盾出版社, 1992. 25~27.

[2] 李长慧, 孙海群, 杨元武. 莖蜀杜鹃种子发芽率的研究[J]. 青海大学学报(自然科学版), 1998, 16(3): 15~17.

[3] 孙振元, 徐文忠, 刘淑兰. 毛白杜鹃耐碱突变体的离体筛选与鉴定[J]. 中南林学院学报, 2003, 23(5): 53~55.

[4] Anderson W C. Propagation of *Rhododendrons* by tissue culture: Part I. development of a culture medium for multiplication of shoot[J]. Proc Intl Plant Prop Soc, 1975, 25: 29~135.

[5] 范玉清. 国外杜鹃花组织培养发展概况[J]. 生物学杂志, 1996, 13(2): 30~31.

[6] Preece, J E, Imel M R. Plant regeneration from leaf explants of *Rhododendron* 'PJM Hybrids' [J]. Scientia Horticulturae, 1991, (48): 159~170.

[7] 张小红, 张红燕, 武军. TDZ 对香椿愈伤组织诱导及芽增殖生长等的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版) 2002, 30(5): 35~39.

Study on technique tissue culture in *Rhododendron anne* Franch

MIAO Yong - mei^{1, 2}, WANG Yong - qing¹, ZHUANG Ping³, JIAN Xing²

(1. College of Forestry and Horticulture, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China;

2. College of Life Science, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China;

3. Westem China Sub - alp Arboretum Chinese Academy of Sciences, Dujiangyan 611830, China)

Abstract: The shoots and leaves from tube seedlings of *R. . anne* Franch were used as explants. The best medium for different explants in vitro culture was chosen by means of the orthogonal experiment design, analysis of variance and multiple comparisons. The test proved that amended MS, 6-BA and KT did not suit for tissue culture of *R. anne* Franch. Relatively low concentration Thidiazuron induced plant differentiation. The established system could protect rare *Rhododendron* and its fast propagation.

Key words: *Rhododendron*; tissue culture; thidiazuron; activated carbon